

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - ICBIM  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

FELIPE CRISO FERREIRA

SIAL: AUTOMATIZAÇÃO DE ANÁLISES DE PARAMETROS ESPAÇO-TEMPORAIS  
PARA MODELOS DE COMPORTAMENTO ANIMAL NO LABIRINTO EM CRUZ  
ELEVADO E CAMPO ABERTO

Uberlândia

2019

FELIPE CRISO FERREIRA

SIAL: AUTOMATIZAÇÃO DE ANÁLISES DE PARAMETROS ESPAÇO-TEMPORAIS  
PARA MODELOS DE COMPORTAMENTO ANIMAL NO LABIRINTO EM CRUZ  
ELEVADO E CAMPO ABERTO

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado à disciplina de TCC II  
como requisito parcial para obtenção  
do título de bacharel em  
Biomedicina pela universidade federal  
de Uberlândia, sob a orientação do  
Professor Doutor Tarciso Tadeu  
Miguel.

Uberlândia

2019

## SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT .....	5
AGRADECIMENTOS .....	6
1- INTRODUÇÃO.....	7
2- JUSTIFICATIVA.....	10
3- OBJETIVO .....	11
3.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4- METODOLOGIA .....	12
4.1- Animais .....	12
4.2- Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	12
4.3- Campo Aberto .....	13
4.4- Vídeos .....	13
4.5- Análise comportamental.....	14
4.6- SIAL (Sistema Integrado de Análises Laboratoriais).....	14
4.6.1- Especificações.....	14
4.6.2- Computador de desenvolvimento .....	15
4.6.3- Componentes do Sistema .....	15
4.6.4- Algoritmo de Rastreamento .....	16
4.7- Análise Estatística .....	17
5- RESULTADOS .....	19
5.1.1 – Dados amostrais brutos analisados em três diferentes metodologias ....	19
5.1.2 – Relação Rastro x Tempo nos quadrantes do campo aberto.....	20
5.1.3 – Contraste por categoria (Entradas, tempo e distância) entre os resultados brutos das tabelas 1, 2 e 3.....	21
5.1.4 - Testes comparativos entre os grupos analisados individualmente em suas respectivas metodologias. ....	23
5.2– LCE (Labirinto em Cruz Elevado).....	26
5.2.1 – Dados amostrais brutos analisados em duas diferentes metodologias ..	26
5.2.2 – Relação Rastro x Tempo nos quadrantes do Labirinto em cruz elevado	27
5.2.3 – Testes comparativos em contraste com as diferentes metodologias.....	28
6- DISCUSSÃO.....	30
7- CONCLUSÃO .....	32
REFERÊNCIAS .....	33

## RESUMO

Ansiedade e depressão são doenças de grande prevalência na população, estima-se que cerca de 9,3% da população brasileira sofre com algum tipo de transtorno de ansiedade (WHO, 2017). Estudar tais transtornos é de elevada importância para a saúde geral do país e, desta forma, muitos estudos trabalham para simular tais comportamentos de ansiedade em camundongos a fim de evoluir no diagnóstico e tratamento em humanos. Atualmente são usados aparatos que provocam comportamentos nos animais que se assemelham aos sintomas de ansiedade e depressão, para essa associação, e, metodologias de análises são usadas a fim de quantificar tais comportamentos. O presente estudo objetivou mostrar uma nova tecnologia criada para automatizar as análises (SIAL) feitas atualmente apenas por experimentadores treinados ou na compra de outro software considerado de referência na área. O software SIAL se mostrou estável em todos os testes não apresentando nenhuma diferença estatística quando contrastado com a metodologia de um experimentador treinado e/ou metodologia do software de referência, porém a necessidade de alterações nas análises foi percebida, uma vez que o software ainda em desenvolvimento necessita de maiores testes e ajustes para se adequar a uma gama de outras situações.

**Palavras chave:** Ansiedade, depressão, análises comportamentais, SIAL.

## **ABSTRACT**

Anxiety and depression are diseases of great prevalence upon the population, it is estimated that nearly 9,3 percent of the brazilian population suffers from any kind of anxiety disorder (WHO,2017). Because of this, the study of this disorders becomes significant in the field of general public health of the country. In this sense, many studies are carried out through rodents behavioral models, in order to understand these pathologies. Currently, appliances are used to bring those behaviors in animals that resemble to the symptoms of anxiety and depression, for association, and, analysis methodologies are used in order to quantify such behaviors. The present study aimed to show a new technology created to automate the analysis (SIAL) made currently and only for trained experimenters or by the purchase of another software considered reference in the area. The software SIAL showed itself stable in all the tests, not presenting any statistical difference when compared with the methodology of a trained experimenter and/or the methodology of the reference software, although the need for alterations in the analyzes was observed, since the software still in development needs additional tests and adjustments to suit a range of other situations.

**Key-words:** Anxiety, depression, behavior analysis, SIAL.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer e dedicar este trabalho a essas pessoas:

Minha família, meu pai Flávio por acreditar no meu potencial, minha irmã Mariana por participar desse projeto, meu irmão Giovanni por estar ao meu lado neste último ano, minha mãe Rosângela por olhar por mim de onde estiver e aos outros familiares por me darem forças para seguir em frente.

A minha namorada Isadora pelo amor, carinho, apoio e amparo até mesmo nos momentos mais difíceis, e a sua família por me acolherem nessa cidade tão longe de casa.

Aos meus cães por me distraírem, alegrarem e estarem sempre ao meu lado com amor incondicional.

Ao mestrando Gustavo por disponibilizar os vídeos usados nesse projeto.

A professora Benvinda, por há muito tempo me dar a inspiração para criar esse software.

O professor Alberto por me ajudar no desenvolvimento da metodologia para modelos de nado forçado.

Meu orientador que apesar das dificuldades se esforçou ao máximo para conseguir me ajudar na confecção deste projeto bem com na minha formação acadêmica.

E por fim a mim mesmo, por nunca desistir, passar por todas as dificuldades no processo da graduação e principalmente no projeto de conclusão da mesma, por me reerguer perante as desaprovações e me esforçar ao máximo até o último momento para concluir todos os projetos iniciados nesses quatro anos de faculdade.

## 1- INTRODUÇÃO

Transtornos de Ansiedade e de depressão são assuntos de caráter comum e conhecidos pela população em geral e, apesar de serem doenças que estabelecem relação possuem suas características próprias. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgado no dia 23 de fevereiro de 2017, 9,3% dos brasileiros apresenta algum tipo de transtorno de ansiedade e 5,8% foram diagnosticados com Depressão. Sendo um problema de saúde pública, o Brasil é o primeiro colocado no ranking mundial com o maior índice de prevalência de ansiedade (WHO, 2017), sendo ela o transtorno mental mais comum que resulta em consideráveis prejuízos funcionais ao indivíduo e sofrimento do mesmo (BERNIK; MINUTTENTAG, 2004).

A ansiedade é advinda das respostas do sistema nervoso central frente a um estresse, normalmente, talvez de modo simplista, associada a um estresse momentâneo e intenso, sendo essa resposta, um recurso muito importante para a adaptação em um ambiente, já que modula comportamentos que auxiliam e podem aumentar a taxa de sobrevivência do indivíduo em determinadas situações. Estímulos aversivos que apresentam ameaças a sobrevivência de um animal geram respostas comportamentais que são resultado da soma de liberação de hormônios e neurotransmissores (cortisol, glutamato, adrenalina, CRF/ACTH) a fim de preparar o animal para a situação, adotando uma postura defensiva (fuga) ou ofensiva (luta) segundo uma avaliação de risco. Por esse motivo o homem, segundo o modelo evolutivo proposto por Charles Darwin, compartilha tais mecanismos e emoções que possibilitam a comparação desses comportamentos com outras espécies animais (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004). Contudo, tal comportamento pode perdurar como ansiedade generalizada e quando em níveis acima do normal tornam-se incapacitantes e patológicos (GRAEFF; BRANDÃO, 1999) quando em condições que não oferecem perigo algum ao indivíduo, tornando-se assim comportamentos mal adaptados (BLANCHARD et al., 2001; GRAY; MCNAUGHTON, 2000; MCNAUGHTON; CORR, 2004). As principais características dos transtornos de ansiedade são descritas como: fobia, medo, ansiedade generalizada e pânico (KESSLER et al., 2012), e em alguns casos podem provocar alterações fisiológicas como: fadiga, sudorese, taquicardia e inquietação (COMAI; GOBBI, 2014).

Já a depressão é descrita como um distúrbio de humor caracterizado principalmente pela frequência excessiva de pensamentos negativos, infelicidade,

apatia e pessimismo. Existem dois tipos principais de síndromes depressivas, são elas: Unipolar (Alterações de humor sempre na mesma direção) e bipolar (na qual a depressão se alterna com a mania) (RANG, H. P. et al.). Este transtorno pode estar relacionado com heranças genéticas que podem induzir a sensibilidade à estímulos externos de origem aversiva e/ou nociva ao indivíduo geralmente de respostas a “estresses inescapáveis” e mais frequentes (experiência do estímulo durante um longo período da vida) (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003), bem como a alteração no equilíbrio de citocinas, perda, diminuição ou ausência de neurotransmissores presentes na fenda sináptica (Serotonina, noradrenalina e dopamina) e alterações nos estímulos glutamatérgicos e GABAérgicos (VLAINÍĆ *et al*, 2016). Embora a característica mais comum da depressão seja a proeminência de um sentimento de tristeza, outros sintomas são experimentados por aqueles que sofrem desse distúrbio, como a perda da capacidade de experimentar o prazer, redução do interesse ao ambiente e sensação de fadiga ou perda de energia. Desta forma o diagnóstico da depressão precisa levar em conta aspectos psicológicos, físicos e comportamentais (DEL PORTO, 1999).

Dentro do contexto de ansiedade e depressão muitos estudos são realizados para tentar entender e modular as respostas que os homens e os animais exibem frente a estímulos dessa natureza. Nesse sentido, o estudo em espécimes animais como o camundongo é de elevada importância para o melhor entendimento destes mecanismos e, para isso, são usadas frequentemente metodologias já descritas na literatura para desencadear determinados comportamentos frente a situações específicas e associá-los com sintomas de ansiedade e/ou depressão como os conhecemos. Tais metodologias utilizam-se de aparatos específicos, e estes por sua vez desencadeiam naturalmente respostas comportamentais nos modelos animais.

Os estudos de MIGUEL, GOMES e NUNES-DE-SOUZA de 2014, por exemplo, utilizando o teste de labirinto em cruz elevado (LCE) para analisar o comportamento dos grupos com e sem o efeito de corticotropina previamente injetados no córtex pré-frontal medial, analisando o efeito da injeção no comportamento relacionado a ansiedade em tal aparato, determinando o tempo e a frequência em que o animal ficou exposto nos diferentes braços a fim de traçar um perfil comportamental para o animal, onde, segundo a metodologia a permanência de um animal no braço aberto indica que a droga teve um comportamento ansiolítico na região injetada e a aversão do animal para com o braço aberto indica que a droga



tem um comportamento ansiogênico na região injetada. Outro exemplo é o estudo do animal no aparato de campo aberto e a relação de seu comportamento sobre estresse agudo e crônico e seu impacto na depressão, novamente determinando o tempo nos quadrantes do aparato, a locomoção do animal bem como comportamentos expressos por ele durante o experimento (KATZ; ROTH; CARROLL, 1981).

Essas metodologias geralmente envolvem sessões de filmagem dos experimentos para análises posteriores onde o experimentador assiste às gravações e registra todos os dados, o que demanda muito tempo e envolve diversas variáveis humanas como subjeção, distração e cansaço as quais podem afetar sobremaneira a qualidade e fidedignidade de uma análise. Outras metodologias que envolvem análises computacionais geralmente são de alto custo financeiro para obtenção de licenças de uso e assinatura, além de complicadas para usuários leigos ou de difícil acesso pela comunidade científica.

Por esses motivos, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e a comparação do software SIAL (Sistema Integrado de Análises Laboratoriais) desenvolvido pelo aluno autor desse trabalho de conclusão de curso, com a metodologia de análise humana por um experimentador treinado e um representante de um software pago considerado referência já lançado no mercado.

## **2- JUSTIFICATIVA**

Com relação às análises comportamentais feitas por humanos citadas acima foi percebido anteriormente que estas podem estar suscetíveis a erros, além de serem demoradas. Mesmo que exista uma metodologia prévia, para padronização da análise e adotando-se práticas para minimizar viés, algumas vezes a análise humana pode sofrer falhas. Para isso, foram criados softwares que automatizam e aceleram o processo, eliminando as variáveis humanas e tornando a análise mais precisa, confiável e mais fácil de ser replicada.

Porém, o software considerado padrão ouro, já lançado e estabelecido no mercado pode ser considerado de difícil acesso devido ao seu alto custo. Desta forma, existe ainda um espaço a ser preenchido que abrangeria o fácil acesso à tecnologia, além de que a mesma seja confiável, precisa e de preferência de baixo custo.

O presente trabalho se justifica então, desta maneira, podendo se caracterizar como um veículo de pesquisa e informação nova para preencher esta lacuna presente no mercado.

### **3- OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um software capaz de analisar os parâmetros espaço-temporais necessários nas análises comportamentais dos aparatos Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Campo Aberto.

#### **3.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Desenvolver e comparar o software desenvolvido (SIAL) com a metodologia usada atualmente (Análise humana) e outro software já desenvolvido no mercado considerado padrão ouro.

## 4- METODOLOGIA

### 4.1- Animais

Foram utilizados camundongos c57bl/6 e Swiss machos mantidos sob condições controladas de temperatura ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luz (ciclo de 12h/12h com luzes apagadas às 19h), com livre acesso a água e alimento, exceto durante a realização dos experimentos. Nota: os animais usados foram referentes a outros estudos, sendo aqui utilizados somente os vídeos gravados pelos experimentadores, por esse motivo não houve necessidade de adesão ao comitê de ética para o desenvolvimento do projeto.

### 4.2- Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O aparato possui dois braços abertos (sem paredes laterais) e dois braços fechados (com paredes laterais) de medidas 30cm comprimento x 5cm largura x 0,25cm altura e 30cm comprimento x 5cm largura x 15cm altura respectivamente. Os braços se unem por uma estrutura central de 5cm de comprimento por 5cm de largura. O aparato todo se eleva do solo por um suporte de madeira de 38,5cm de altura. Cada animal é colocado no aparato e permitindo que explorem livremente os braços durante cinco minutos (tempo de gravação da análise em vídeo) para serem analisados posteriormente.

**Fig. 1.** Labirinto em cruz elevado

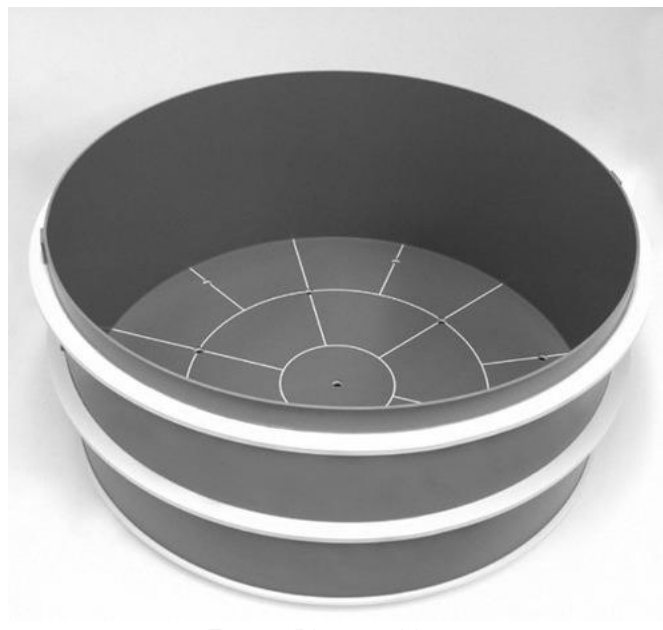


**Fonte:** Site laboratório de genética do comportamento

### 4.3- Campo Aberto

O aparato não possui quaisquer divisões físicas, possuindo apenas 25 divisões (quadrantes) visuais em sua plataforma, sendo 1 central, 8 médios e 16 periféricos, o campo aberto é redondo e possui um diâmetro de 39.5 cm. Cada animal é colocado no aparato e permitindo que explorem livremente seus quadrantes. Quadrantes esses que são considerados centrais (os centrais e os médios) e periféricos (os periféricos) as análises são gravadas por 10 Minutos segundo sua metodologia para análises posteriores.

**Fig. 2.** Campo aberto



**Fonte:** Blog tumblr

### 4.4- Vídeos

Os vídeos usados para o presente estudo já estavam disponíveis no laboratório gravados para estudos anteriores (ainda não publicados), dentre ele foram usados 18 vídeos no aparato campo aberto e 17 vídeos no aparato labirinto em cruz elevado. Apenas o campo aberto pôde ser comparado com o software referência, pois já tinham análises prévias.

#### **4.5- Análise comportamental**

A atividade de cada camundongo no labirinto em cruz elevado e no campo aberto foi documentada em filmagens de 5 e 10 minutos respectivamente através de um circuito filmadora-computador e processada posteriormente. O processamento dos vídeos levou em consideração análises de parâmetros espaço-temporais: frequência de entradas em unidades e porcentagem e o tempo de permanência do animal em segundos e porcentagem nos braços abertos, fechados e no quadrante central para o labirinto em cruz elevado bem como nos diferentes quadrantes do teste de Campo aberto. Cada vídeo foi analisado nas três metodologias diferentes (Experimentador treinado, SIAL e referência), exceto aqueles que foram analisados duas vezes (Experimentador treinado, SIAL) por não existir análises prévias no software de referência.

#### **4.6- SIAL (Sistema Integrado de Análises Laboratoriais)**

##### **4.6.1- Especificações**

O software Sial foi desenvolvido no Visual Studio 2010 e 2017 utilizando a linguagem de programação C#, sendo o C# uma linguagem de programação de alto nível (nível de linguagem elevada, ou seja, mais longe da linguagem das máquinas e mais próximo da linguagem humana, pois usa-se comandos em inglês e não binários) e de baixa complexidade o que a torna uma linguagem de programação acessível e de fácil entendimento até mesmo para pessoas que não estão familiarizadas com programação.

Como seu desenvolvimento é atrelado diretamente com o Visual Studio (Ferramenta de desenvolvimento de softwares do Windows) o Sial é um sistema que precisa da plataforma Windows para seu funcionamento e, portanto, utiliza-se da biblioteca “net framework”, facilitando assim a integração de outros componentes de hardware, outras bibliotecas, arquivos de mídia e drivers que possam ser necessários para o funcionamento do software (SEBESTA, 2018).

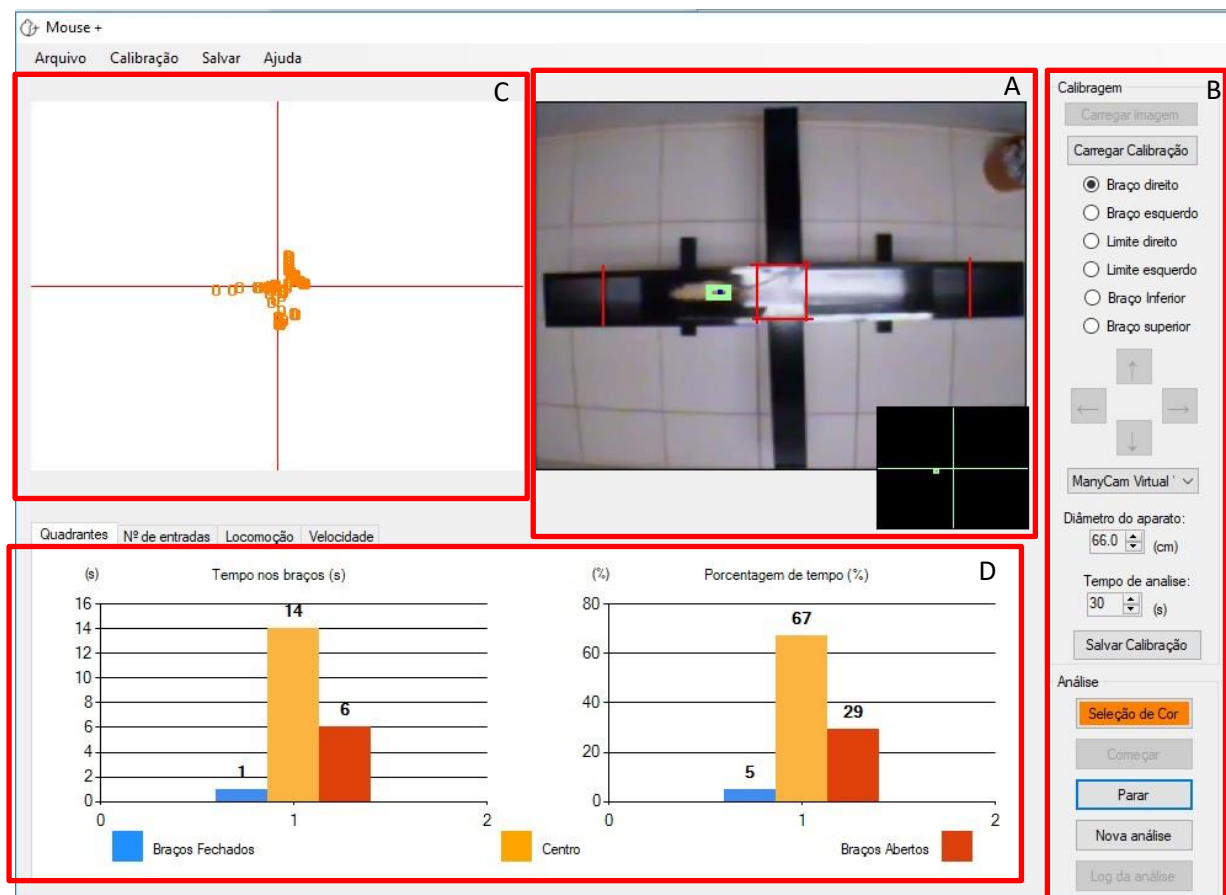
#### **4.6.2- Computador de desenvolvimento**

O desenvolvimento do Sial foi feito em grande parte em um notebook de uso comum com as seguintes configurações: Intel core i5 CPU @1.70 GHz, 6Gb de memória RAM e um computador de uso pessoal: Intel core i3 CPU @3.8GHz, 8gb de memória RAM ambos rodando a versão mais atual do windows 10. Porém, uma vez compilado, o software foi testado em diversas outras configurações de computadores e de sistemas windows inferiores o que não comprometeu seu funcionamento e/ou seu desempenho.

#### **4.6.3- Componentes do Sistema**

O sistema é dividido em 2 partes sendo elas: “Calibragem e execução”, onde o experimentador tem a possibilidade de ajustar os parâmetros do sistema e salvá-los para garantir que todas as análises sejam feitas como os mesmos critérios e “Análise e registros”, onde o experimentador pode ver em tempo real a análise sendo executada, bem como o registro de todos os dados obtidos pelo sistema no tempo desejado de vídeo.

A interface do sistema permite o usuário se adaptar a metodologia de gravação usada através da ferramenta de calibragem, também existe a possibilidade de visualizar todo o trajeto percorrido pelo animal em tempo real e seu rastro de locomoção.

**Fig. 3.** Interface gráfica do Sial

**Fig. 3.** “A”: Módulo de vídeo e rastreamento em tempo real (Enquadramento demonstrado no Animal). “B”: Ferramentas de calibragem. “C”: Rastro do animal durante todo o tempo de análise (Áreas com maior densidade indicam maior tempo de permanência no local). “D”: Dados espaço-temporais obtidos (Tempo e número de entradas nos quadrantes bem como gráficos de locomoção e velocidade média do animal).

#### 4.6.4- Algoritmo de Rastreamento

O SIAL inclui um algoritmo de rastreamento simples baseado na comparação de cor, o usuário precisa definir uma cor específica RGB (é a sigla do sistema de cores aditivas formado pelas iniciais das cores em inglês “Red”, “Green” e “Blue”, a mistura das diferentes intensidades das três cores resultam em qualquer cor do espectro visível) na qual deseja rastrear, note que o sistema tem uma alta sensibilidade e por isso a qualidade da imagem é de extrema importância para o reconhecimento e rastreo adequado do material de estudo, imagens com baixa qualidade, menores ou igual a 360pi necessitam de um contraste maior entre o material de estudo e o ambiente.

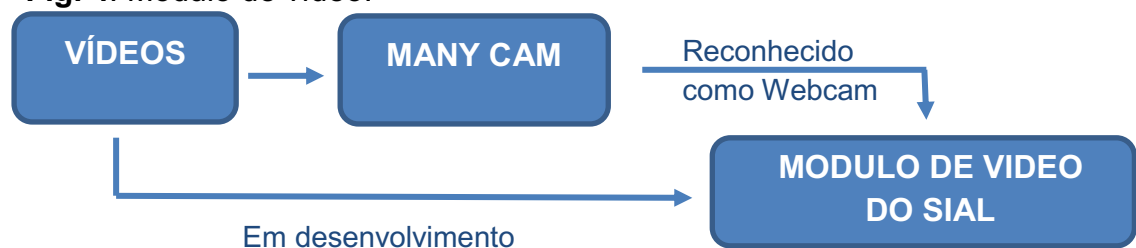


O rastreamento é feito por pixel (ponto que pode assumir uma cor RGB, o conjunto de pixels geram uma imagem), a cada novo frame (quadro ou imagem fixa, o conjunto dos frames sequenciais geram um vídeo) o sistema automaticamente identifica o pixel ou conjunto de pixels da cor desejada exibindo um enquadramento e rapidamente armazena os dados de localização x e y do(s) pixels em questão.

Os cálculos efetivos de análise comportamental são efetuados a cada 200ms e a atualização gráfica na interface do sistema a cada 1 (um) segundo. A atualização da interface e cálculos a cada frame do vídeo provocaria uma dessincronização entre a análise e o vídeo, uma vez que o tempo de execução completo da tarefa de cálculo e processamento gráfico (+/- 100ms) seria maior que o tempo decorrido entre um frame e outro (24fps = 1 frame a cada 41.6ms).

A versão atual do sistema trabalha diretamente com análise de vídeo em tempo real, para isso o SIAL identifica automaticamente dispositivos de Webcam instalados e os exibe na interface como escolha de uso, porem no presente estudo como havia a necessidade e analisar o mesmo teste em metodologias diferentes foi utilizado a versão gratuita do software “Many Cam” encontrado no site <https://manycam.com/> para simular uma Webcam em tempo real e através dessa ferramenta passar as imagens gravadas para o SIAL, uma vez que a versão do SIAL capaz de abrir e executar diretamente vídeo em sua interface ainda está em desenvolvimento.

**Fig. 4.** Modulo de vídeo.



**Fig. 4.** Via de acesso do Vídeo ao modulo de exibição e processamento de imagem do SIAL.

#### 4.7- Análise Estatística

Os resultados foram analisados através de um teste de Homogeneidade e posteriormente pelo Teste “t” de Student ou ANOVA conforme apropriado ao

desenho experimental no software Statistica 10.0. As alterações significativas consideradas quando  $p < 0,05$ .

## 5- RESULTADOS

### 5.1 – Campo Aberto (do inglês Open Field)

#### 5.1.1 – Dados amostrais brutos analisados em três diferentes metodologias

As análises comportamentais foram coletadas a partir de um vídeo comum gravado com cada animal e processadas no software Referência, Sial e por um experimentador treinado.

**Tabela 1.** Software Referência

Tratamento	Distância (m)	Entradas no Centro (un)	Tempo no Centro (seg)	Entradas na Periferia (un)	Tempo na periferia (seg)
Não Exposto	31.70	54	139.3	54	460.7
Não Exposto	32.88	61	118.1	61	481.9
Não Exposto	40.11	67	78.5	66	521.5
Não Exposto	26.36	42	97.8	42	502.2
Não Exposto	24.03	41	96.8	41	503.2
Ter Repetido	32.69	54	102.5	54	497.5
Ter Repetido	39.43	67	122.4	67	477.6
Ter Repetido	16.95	43	223.0	42	377.0
Ter Repetido	20.06	41	154.6	41	445.4
Ter Repetido	37.80	64	126.0	64	474.0
Ter Repetido	38.47	58	94.0	58	506.0
Ter Repetido	35.00	66	110.2	66	489.8
Ter Único	37.90	63	135.0	64	465.0
Ter Único	37.16	68	149.5	67	450.5
Ter Único	30.81	55	128.9	55	471.1
Ter Único	37.52	70	113.6	69	486.4
Ter Único	24.42	55	133.3	54	466.7
Ter Único	24.62	65	184.6	65	415.4

**Tabela 2.** Sial

Tratamento	Distância (m)	Entradas no centro (un)	Tempo no centro (s)	Entradas na Periferia (un)	Tempo na periferia (s)
Não Exposto	33.03	47	136.2	47	463.8
Não Exposto	34.68	55	120.2	56	479.8
Não Exposto	39.42	71	92.0	70	508.0
Não Exposto	28.62	43	102.2	43	497.8
Não Exposto	27.42	49	86.2	49	513.8
Ter Repetido	36.70	67	94.4	67	505.6
Ter Repetido	41.06	65	113.8	65	486.2

Ter Repetido	20.17	57	236.2	56	363.8
Ter Repetido	23.82	45	152.2	46	447.8
Ter Repetido	40.07	76	125.2	77	474.8
Ter Repetido	40.26	61	84.4	62	515.6
Ter Repetido	37.34	63	112.0	64	488.0
Ter Único	39.87	69	131.4	69	468.6
Ter Único	37.91	65	148.8	66	451.2
Ter Único	33.57	56	130.2	56	469.8
Ter Único	40.21	64	98.2	63	501.8
Ter Único	27.62	53	130.8	53	469.2
Ter Único	27.67	58	185.8	58	414.2

**Tabela 3.** Experimentador treinado

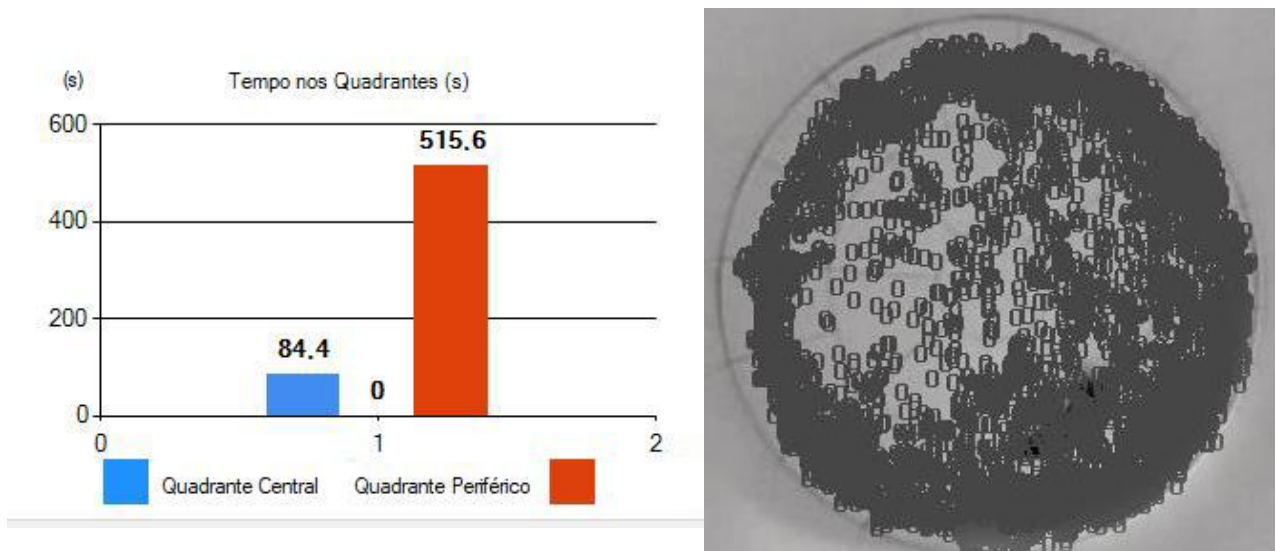
Tratamento	Distância (m)*	Entradas no centro (un)	Tempo no centro (s)	Entradas na Periferia (un)	Tempo na periferia (s)
Não Exposto	x	51.00	137	50.0	463
Não Exposto	x	57.00	120	57.0	479
Não Exposto	x	70.00	93	69.0	507
Não Exposto	x	43.00	102	43.0	497
Não Exposto	x	44.00	88	44.0	513
Ter Repetido	x	62.00	94	62.0	505
Ter Repetido	x	65.00	113	65.0	487
Ter Repetido	x	52.00	238	51.0	363
Ter Repetido	x	43.00	155	43.0	446
Ter Repetido	x	70.00	126	71.0	474
Ter Repetido	x	61.00	85	62.0	516
Ter Repetido	x	63.00	112	64.0	488
Ter Único	x	64.00	133	64.0	468
Ter Único	x	66.00	149	67.0	452
Ter Único	x	56.00	130	56.0	469
Ter Único	x	66.00	97	65.0	503
Ter Único	x	53.00	131	53.0	468
Ter Único	x	61.00	186	61.0	415

\*Impossível medir a distância percorrida do animal. Não exposto: Animal nunca exposto ao aparato, Ter repetido: animal exposto várias vezes ao aparato, Ter único: animal exposto apenas uma vez no aparato.

### 5.1.2 – Relação Rastro x Tempo nos quadrantes do campo aberto

As análises dos animais exibem rastros em tempo real, à medida que o tempo avança o preenchimento dos gráficos se tornam mais completos, e ao fim da análise um modelo de comportamento baseado na permanência do animal em determinada área do aparato pode definir seu perfil de comportamento.

**Fig. 5** Gráfico de rastro por tempo nos quadrantes no campo aberto

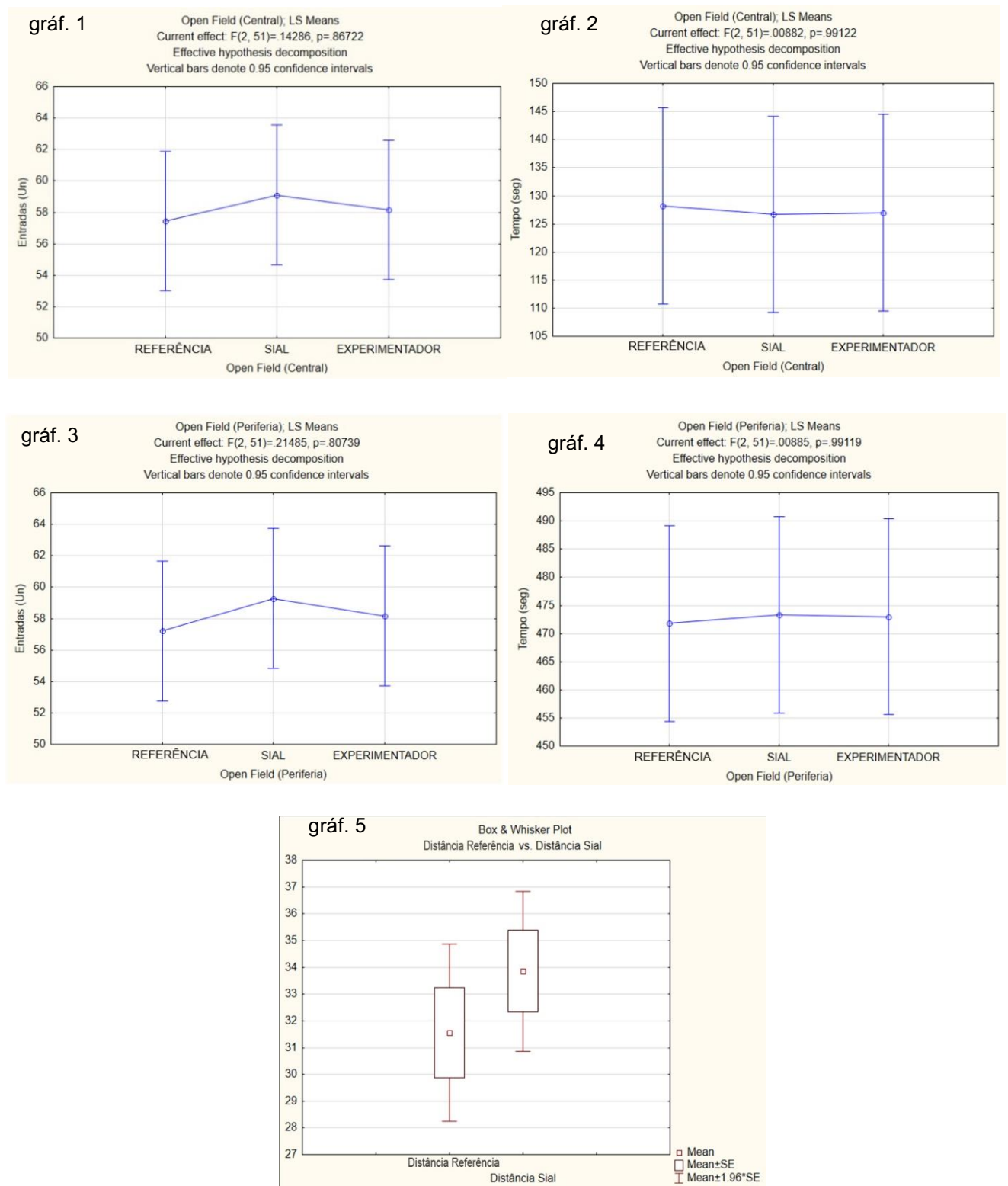


**Fig 5:** Figura representativa correspondente a uma análise como demonstração da relação entre o tempo de permanência nos quadrantes e o rastro exibido do animal, a imagem demonstra uma maior densidade do rastro nos quadrantes periféricos, o que corrobora ao tempo de permanência do animal nesses quadrantes.

O perfil psicológico e comportamental do animal não necessariamente corresponde diretamente a quantificação de análises dos parâmetros espaço-temporais, uma vez que comportamentos de exploração animal são de extrema importância na avaliação dos resultados, pois mesmo que o tempo no quadrante central tenha sido significativamente menos, o animal ainda sim demonstrou comportamento exploratório em determinada região.

### **5.1.3 – Contraste por categoria (Entradas, tempo e distância) entre os resultados brutos das tabelas 1, 2 e 3.**

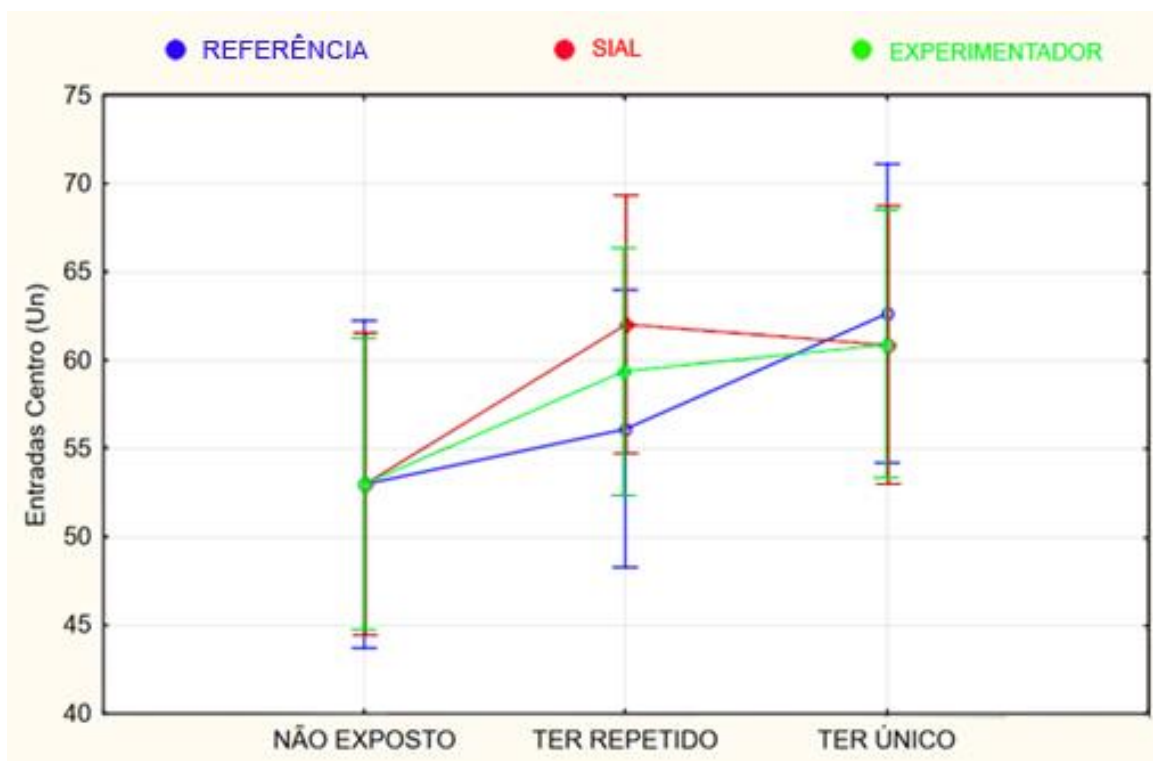
Os resultados obtidos de cada categoria de análise nas três metodologias (Referência, SIAL, Experimentador) foram contrastados utilizando ANOVA. Os testes estatísticos revelaram que, embora as metodologias sejam diferentes, os resultados são semelhantes, uma vez que todas as análises estatísticas não apresentaram quaisquer diferenças significativas e em muitos casos foi observado um grau de semelhança entre as amostras muito elevado ( $p \cong 1$ ).

**Fig. 6** Gráficos comparativos do Open Field.**Fig 6.** Gráfico 1: Entradas no centro;  $p=0.86722$ . Gráfico 2: Tempo no centro;  $p=0.99122$ . Gráfico 3: Entradas na periferia;  $p=0.80739$ . Gráfico 4: Tempo na periferia;  $p=0.99119$ . Gráfico 5: Distância percorrida;  $p=0.677617$ .

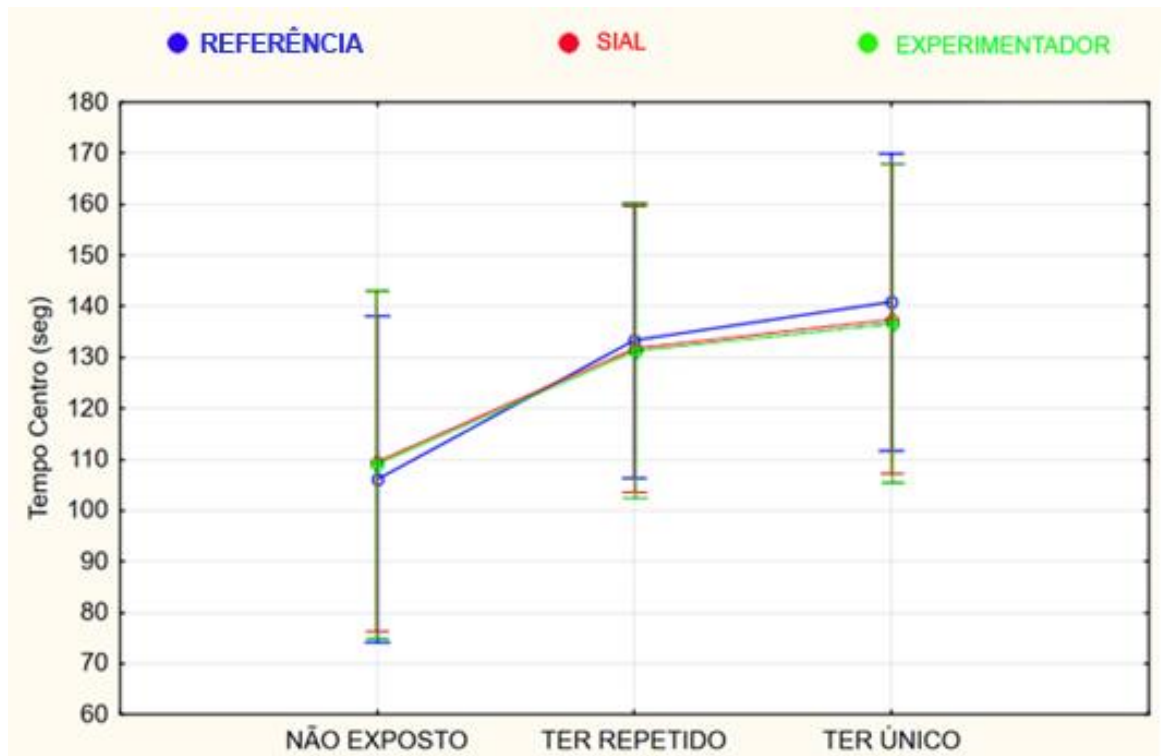
#### 5.1.4 - Testes comparativos entre os grupos analisados individualmente em suas respectivas metodologias.

Os animais inicialmente foram separados em três grupos (Não exposto, Ter repetido e Ter único) e analisados entre si sem contraste entre as diferentes metodologias, desta forma os três grupos geram resultados próprios em suas respectivas metodologias, a fim de simular um resultado real de análise comportamental. Ao analisarmos tais grupos em todas as metodologias, nota-se que os resultados não apresentam diferença significativa em nenhuma das mesmas, isso fica mais claro ao plotarmos seus resultados em um mesmo plano.

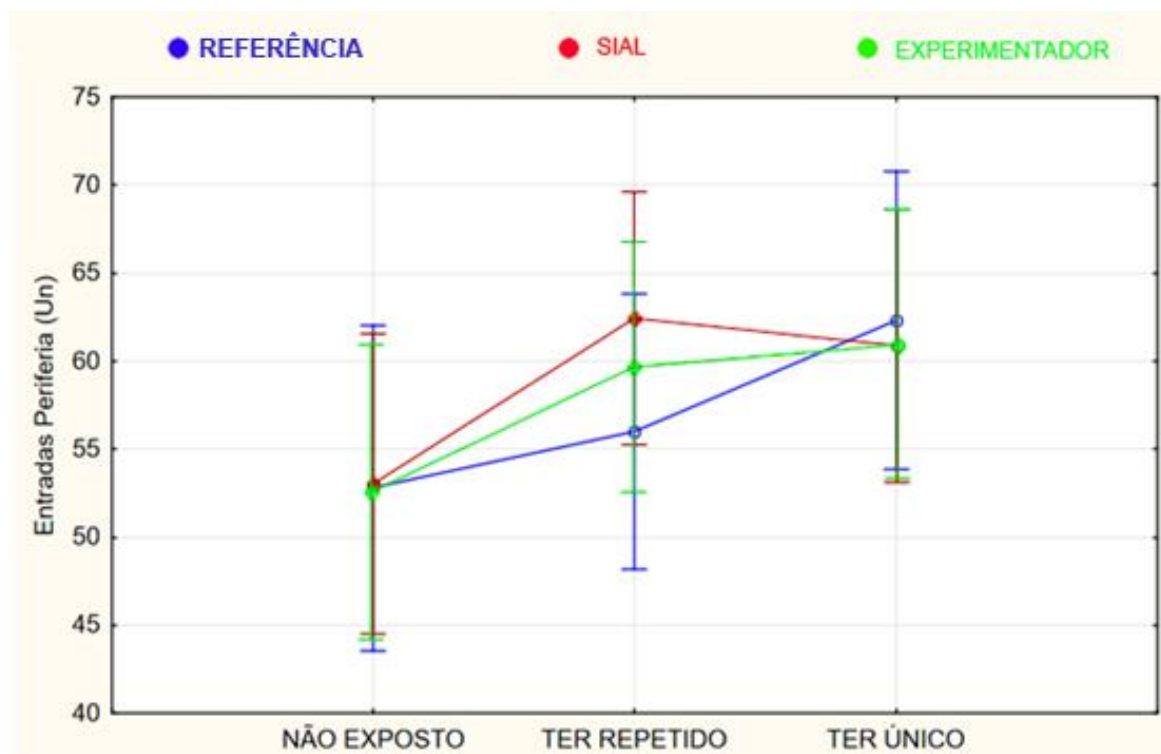
**Gráfico 6.** Entradas no centro por grupos(Software Referência, Sial, Experimentador)



Referência:  $p = 0,265553$ ; Sial:  $p = 0,229536$ ; Experimentador:  $p = 0,306165$

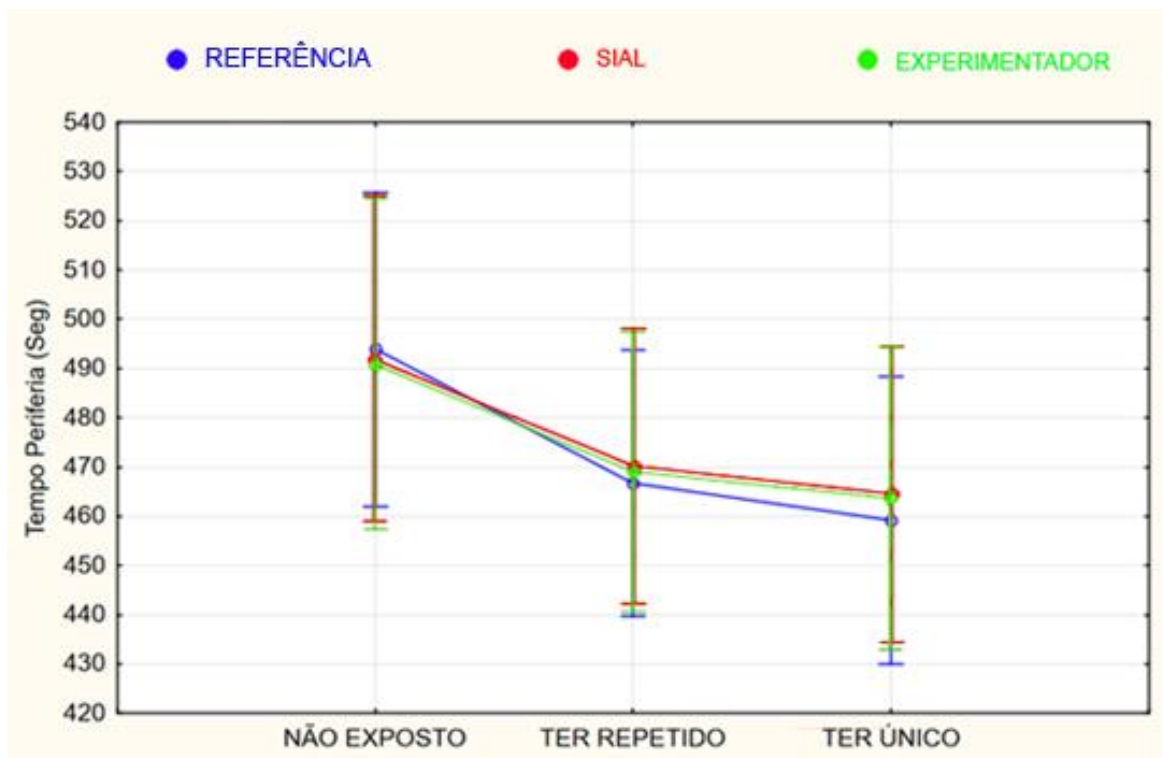
**Gráfico 7.** Tempo no centro por grupos(Software Referência, Sial, Experimentador)

Referência:  $p = 0,235776$ ; Sial:  $p = 0,411012$ ; Experimentador:  $p = 0,428345$

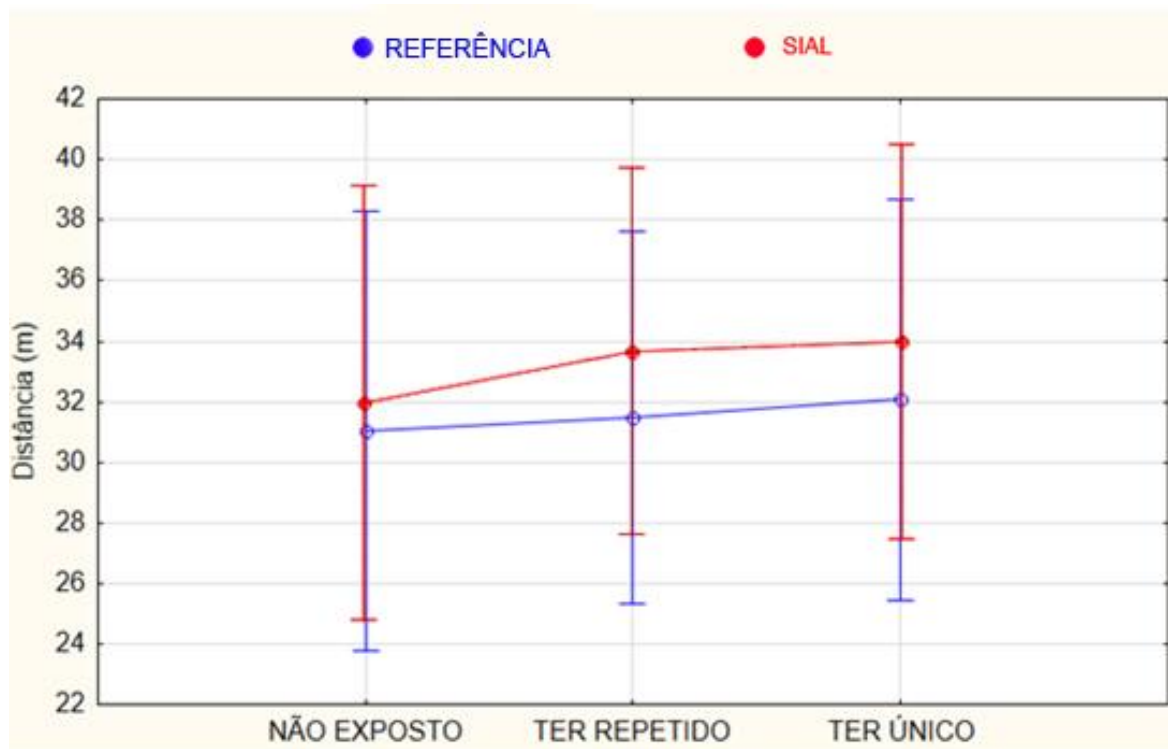
**Gráfico 8.** Entradas na periferia por grupos(Software Referência, Sial, Experimentador)

Referência:  $p = 0,275330$ ; Sial:  $p = 0,204992$ ; Experimentador:  $p = 0,269414$



**Gráfico 9.** Tempo na periferia por grupos (Software Referência, Sial, Experimentador)

Referência:  $p = 0,235776$ ; Sial:  $p = 0,411012$ ; Experimentador:  $p = 0,430111$

**Gráfico 10.** Distância entre grupos (Software Referência, Sial)

Referência:  $p = 0,973772$ ; Sial:  $p = 0,893407$ .

## 5.2– LCE (Labirinto em Cruz Elevado)

### 5.2.1 – Dados amostrais brutos analisados em duas diferentes metodologias

Os vídeos gravados no LCE não possuíam análises prévias no software referência, bem como grupos definidos do experimento, portanto apenas as metodologias do Sial juntamente com a de um experimentador treinado foram contrastadas.

**Tabela 4. Sial**

Tempo Braços Fechados(seg)	Tempo Centro(seg)	Tempo Braços Abertos(seg)	Entradas Braços fechados(un)	Entradas Central(un)	Entradas Braços Abertos(un)
127	139,4	33,6	38	75	39
100,6	109,2	90,2	19	66	54
85,6	96,8	117,6	23	80	57
58,6	76,4	165	10	48	38
103,8	129,6	66,6	24	68	46
90,2	116,2	93,6	22	69	46
89,6	165,4	45	11	35	25
130	52,6	117,4	17	41	24
77	32,8	190,2	16	37	22
202	61,6	36,4	12	34	22
132,4	86,8	80,8	18	32	14
240,2	52,6	7,2	43	55	14
115,6	37,4	147	18	42	24
148	33,6	118,4	14	25	11
93,6	96,2	110,2	22	60	37
150	68,8	81,2	12	35	24
104,2	94,2	101,6	14	43	29

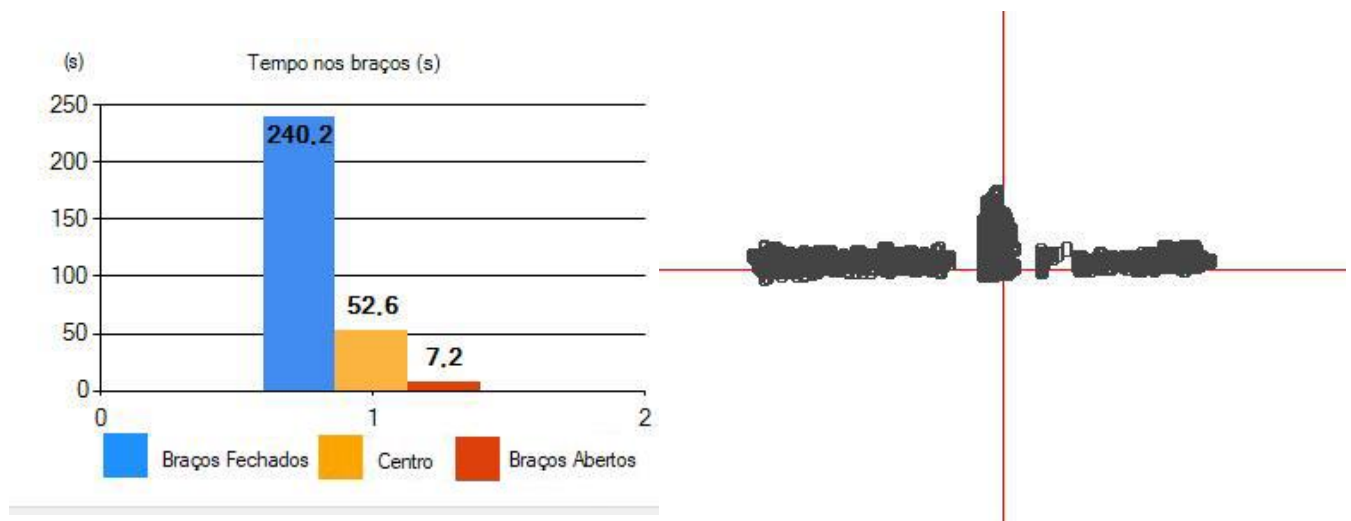
**Tabela 5. Experimentador Treinado**

Tempo Braços Fechados(seg)	Tempo Centro(seg)	Tempo Braços Abertos(seg)	Entradas Braços fechados(un)	Entradas Central(un)	Entradas Braços Abertos(un)
126,5	138,9	33,8	36	70	33
99,8	109,9	90,7	19	63	50
85,1	97,3	118,3	23	76	55
58,9	75,4	165,4	10	46	38
104,6	128,7	66,1	23	64	44
89,9	116	93,1	22	67	45

89,3	165,2	45,1	11	35	25
131,1	52,3	117,2	17	40	24
77,3	33	190,4	16	36	22
201	61,9	36,5	12	33	22
132	87,5	80,3	18	32	14
240,5	52,4	7,4	40	53	14
115,9	37,6	146,7	17	39	23
147,2	33,9	117,9	14	24	11
93,8	96,3	110	21	57	35
150,3	68,9	81,4	12	34	23
103,9	93,8	102,1	14	40	28

### 5.2.2 – Relação Rastro x Tempo nos quadrantes do Labirinto em cruz elevado

**Fig. 7** Gráfico de rastro por tempo nos quadrantes no LCE



**Fig 7:** Figura representativa correspondente a uma análise como demonstração da relação entre o tempo de permanência nos quadrantes e o rastro exibido do animal, a imagem demonstra que o tempo nos braços abertos (Vertical) e a relação com o desinteresse do animal de explorar determinada região.

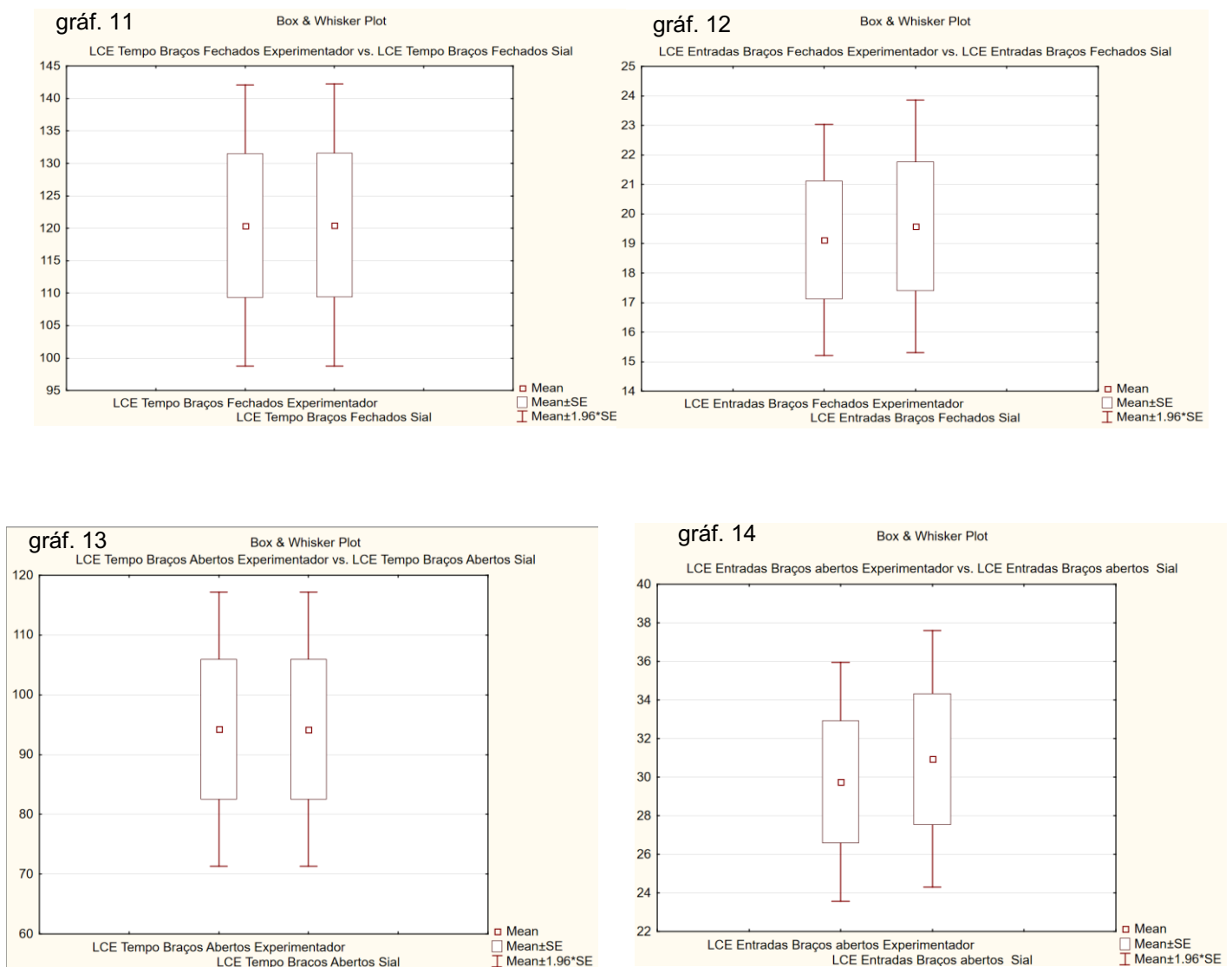
Muitas vezes os dados espaço temporais podem mostrar um uma permanência de tempo relativamente alta ou baixa em determinado quadrante sem expressarem o interesse do animal por explorar determinada região, comportamentos de *Stretch attend posture* (Quando o animal se estica para observar a região) seguidos ou não por *freezing* (Congelamento do animal) podem aumentar o tempo em determinado quadrante, por esse motivo a demarcação de

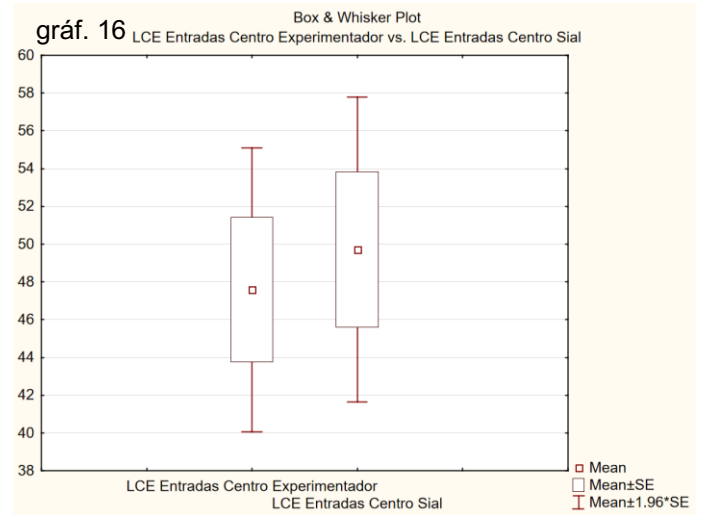
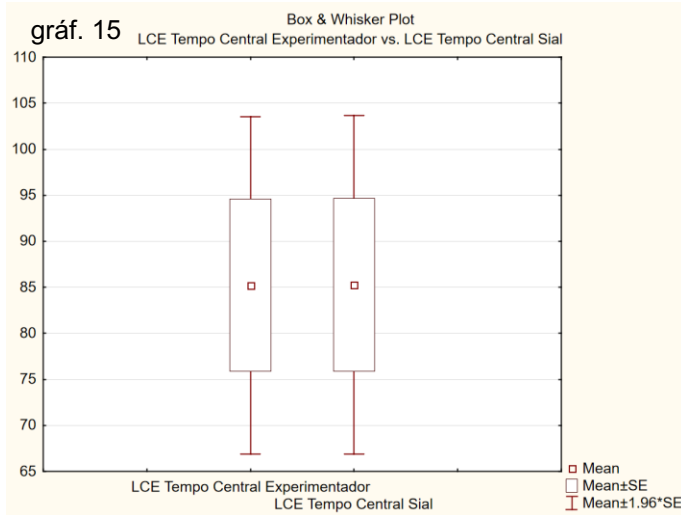
rastro do animal nos indica exatamente o interesse do mesmo ao explorar livremente no tempo de permanência no aparato.

### 5.2.3 – Testes comparativos em contraste com as diferentes metodologias

Novamente, os resultados contrastados das duas metodologias não apresentaram diferenças significativas, e do mesmo modo do Open Field, os tempos nos quadrantes obtiveram um grau de semelhança muito forte.

**Fig. 8** Graficos comparativos no LCE.





**Fig 8. Gráfico 11:** Tempo nos braços fechados;  $p=0,99539$ . **Gráfico 12:** Entradas nos braços fechados;  $p=0,72521$ . **Gráfico 13:** Tempo nos braços abertos;  $p=0,99923$ . **Gráfico 14:** Entradas nos braços abertos;  $p=0,77464$ . **Gráfico 15:** Tempo no Centro;  $p=0,98877$ . **Gráfico 16:** Entradas no Centro;  $p=0,77649$ .

## 6- DISCUSSÃO

Embora os resultados estatísticos relacionados ao aparato Open Field e LCE não apresentem diferença significativa tais metodologias geram resultados brutos distintos, em especial no número de entradas por quadrante, isso se deve ao fato de que a metodologia de análise do Sial atualmente trabalha de apenas uma forma, fazendo uma média do corpo do animal e contabilizando sua entrada a partir do momento em que seu corpo está a mais de 50% em um determinado quadrante, podendo gerar resultados maiores do que o esperado caso o animal permaneça por um longo período de tempo na divisa entre um quadrante e outro (isto se justifica uma vez que nos resultados do LCE essas diferenças são mais sutis pelo fato do mesmo possuir em sua divisa entre os braços fechados e o centro uma espécie de teto que impedia a visualização do animal na região, fazendo com que apenas seja contabilizado o animal no quadrante assim que o mesmo desaparece do quadrante anterior), porém isso não prejudicaria uma análise comportamental real, pelo fato de que todos os animais seriam analisados da mesma forma como um tipo de padronização, porém o SIAL se comporta desta maneira devido a gravação dos animais não seguirem as corretas exigências da metodologia do software, tendo que ser adequadas para a captura no software, essa adequação ocorre pois os animais gravados previamente não foram marcados com uma cor RGB no local específico para a análise (acima das patas traseiras) fazendo com que o software só pudesse captar o animal por inteiro.

Outras ligeiras diferenças (distância e tempo nos quadrantes) podem ocorrer uma vez que existem diferenças entre calibrações de software impassíveis de exportação/importação multiplataforma e suscetibilidade a erros humanos com relação ao caso de análises feitas por um experimentador.

Porém, em questão de confiabilidade e precisão, todos os testes em software se mantêm constantes independentemente do número de análises, desta forma não há relevância no número de vezes que o vídeo for analisado o resultado sempre será o mesmo. Por outro lado, em análises realizadas por um experimentador isso é inviável, uma vez que a imprecisão, subjeção, fadiga e repetição podem prejudicar o desempenho da análise. Portanto, há a necessidade da mesma análise ser feita pelo menos três vezes pelo experimentador. Tais fatores podem ser observados no

tempo total da análise, das quais o experimentador não consegue contabilizar o tempo exato em cada quadrante, totalizando o tempo com uma pequena margem de erro (Tabela 3: Soma dos tempos dos quadrantes  $\neq$  300seg).

A ferramenta Sial ainda é um sistema em desenvolvimento e necessita diversos outros testes e novas soluções para contemplar todos os tipos de análises comportamentais, problemas na identificação correta da transição de quadrantes podem ser facilmente corrigidas caso sejam seguidas corretamente a metodologia descrita anteriormente (Uso de apenas uma parte do corpo do animal na cor desejada para o rastreio, recomenda-se que seja marcado logo a cima das patas traseiras), bem como desenvolvimento de novos mecanismos para rastrear o animal por inteiro (Marcação de dois pontos do animal: cabeça e acima das patas traseiras, a fim de apenas contabilizar a entrada no quadrante, uma vez que o animal tenha passado inteiramente para o próximo quadrante). E, por fim a atualização futura do software capaz de importar, reproduzir e analisar diretamente arquivos de vídeo já existentes de forma independente sem o uso de softwares de terceiros.

Os estudos realizados com o software Sial se mostraram estáveis em todo o processo, todas as análises feitas e comparadas com as metodologias utilizadas atualmente e o padrão ouro não apresentaram diferenças significativas e em muitos casos obtivemos um grau de semelhança entre os resultados das amostras muito forte, isso prova que apesar do modulo de reconhecimento do animal do Sial ainda precisar de ajustes, seu algoritmo de análise funciona corretamente se equiparando a outros softwares confiáveis e considerados referência.

Em paralelo a finalização desse trabalho, esforços são concentrados na possibilidade real de que esse software seja também útil ao auxilio da análise de outros testes animais como o teste do nado forçado e o teste de reconhecimento de objetos, bem como de labirinto aquático de morris, constituindo, estes dois últimos, importantes ferramentas no estudo da memória, bem como de transtornos que a afeta.

## **7- CONCLUSÃO**

O software desenvolvido (SIAL) apresentou resultados promissores para os testes avaliados e, embora sejam necessárias adaptações, poderá ser uma ferramenta útil para auxiliar as análises comportamentais nestes e em outros testes comportamentais em animais de laboratório.



## REFERÊNCIAS

BERNIK, M.A.; MINUTTENTAG, N.W. Farmacoeconomia. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**, 1a. ed., p.409-419, São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

BLANCHARD, D.C, et al. **Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-humans mammals**. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.25(7-8), p.761-770, 2001.

COMAI, Stefano; GOBBI, Gabriella. Unveiling the role of melatonina MT2 receptors in sleep, anxiety and other neuropsychiatric diseases: a novel target in psychopharmacology. **Journal Of Psychiatry & Neuroscience**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.6-21, 1 jan. 2014.

Depression and Other Common Mental Disorders. (2017). 1st ed. [ebook] **OMS**, p.18. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf?sequence=1> [Accessed 12 Feb. 2018].

DEL PORTO, José Alberto. Conceito e diagnóstico. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v.21, supl.1, p.06-11, May 1999.

FARIA et al. Anxiety-like responses induced by nitric oxide within the BNST in mice: Role of CRF1 and NMDA receptors. **Hormones And Behavior**, [s.l.], v. 79, p.74-83, mar. 2016.

GENARO et al. Effects of angiotensin (5-8) microinfusions into the ventrolateral periaqueductal gray on defensive behaviors in rats. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 256, p.537-544, Nov. 2013.

GRAEFF, Frederico G. Ansiedade. In: GRAEFF F. G., BRANDÃO M. L. **Neurobiologia das doenças mentais**. 5ª ed. São Paulo: Lemos, 1999, p.135-178

GRAY, J.A.; McNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**, 2<sup>a</sup> Ed. Oxford: Oxford University Press, 2000

JOCA, PADOVAN, GUIMARAES. Estresse, depressão e hipocampo. Rev. **Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 25, supl. 2, p. 46-51, Dec. 2003.

KATZ, ROTH, CARROLL. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.247-251, jun. 1981.

KESSLER, Ronald C. et al. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. **International Journal Of Methods In Psychiatric Research**,[s.l.], v. 21, n. 3, p.169-184, ago. 2012

McNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 28, 285-305, 2004

MIGUEL, GOMES, NUNES-DE-SOUZA. Tonic modulation of anxiety-like behavior by corticotropin-releasing factor (CRF) type 1 receptor (CRF1) within the medial prefrontal cortex (mPFC) in male mice: Role of protein kinase A (PKA). **Hormones And Behavior**, [s.l.], v. 66, n. 2, p.247-256, jul. 2014.

PAXINOS; FRANKLIN. The mouse brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**, California, USA, 2001.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

SANJULIANI et al. Eixo Renina-Angiotensina-Aldosterona: Bases Fisiológicas e Fisiopatológicas. **Hupe**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p.26-27, 10 jul. 2011.

SEBESTA, Robert W. **Conceitos de Linguagem de programação**. 11. ed. Colorado: Bookman, 2018. 735 p.

VLAINIĆ JV, ŠURAN J, VLAINIĆ T, VUKOREP AL. **Probiotics as an Adjuvant Therapy in Major Depressive Disorder**. Curr Neuropharmacol.2016;14(8):952–958.

ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F.G. Modelos Animais. In: HETEM, L.A.B; GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**, 1a. ed., p.55-73, São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

Fig.1. Site laboratório de genética do comportamento link:  
<http://geneticacomportamento.ufsc.br/files/2012/12/LCE-LGC-1-1024x791.jpg>  
 Acesso: 23/06/2019 as 21:03

Fig 2. tumblr link:  
[https://66.media.tumblr.com/38f55e59a6c3d87f6879b34b9c814d20/tumblr\\_inline\\_mp9sv9hwtl1qz4rgp.jpg](https://66.media.tumblr.com/38f55e59a6c3d87f6879b34b9c814d20/tumblr_inline_mp9sv9hwtl1qz4rgp.jpg) acesso:23/06/2019 as 21:10